

STIC-ILL

107 77 360

no 6/6

From: Lukton, David
Sent: Friday, June 06, 2003 11:02 AM
To: STIC-ILL

449454

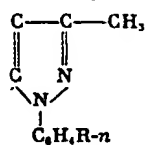
David Lukton
308-3213
AU 1653
Examiner room: 9B05
Mailbox room: 9B01
Serial number: 09/646599

AN 76:46490 CA
TI Hydrolysis of the methyl ester of O-phosphoserine
AU Avaeva, S. M.; Sklyankina, V. A.

CS Mosk. Gos. Univ., Moscow, USSR

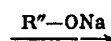
SO Zhurnal Obshchei Khimii (1971), 41(9), 2081-5

CODEN: ZOKHA4; ISSN: 0044-460X



Формула	Вычислено Р, %
$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	7.34
$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	6.88
$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	7.11
$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	6.68
$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{P}$	6.79
$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{P}$	6.40
$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	7.34
$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	6.88
$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	7.11
$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	6.68
$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{P}$	6.79

ИК-спектроскопии
дает аналогично [1]
м бесцветных кри-
VII).



H₃

в (I—VI) имеются
см⁻¹, характерные
фигов (VII—XVII)
ощения ~2600 см⁻¹
в области 1045—
и 1175—1190 см⁻¹
О—Н и Р=О групп
вязей. Обнаружены
⁻¹ (C=C), налагаю-

ь

и р а з о л о н ы - 5
гальдегида и арил-
нагретую до 175°
65—175° в течение
реакции растворяют

в горячей ледяной уксусной кислоте (~5 мл) (в случае неполного раство-
рения бесцветный остаток отделяют фильтрованием). На следующий день
выделившиеся окрашенные кристаллы отфильтровывают, промывают эта-
нолом; для анализа кристаллизуют повторно. Соединения (I—VI) пред-
ставляют собой темно-красные или оранжевые (III, VI) вещества, раство-
римые в органических растворителях, не растворимые в воде.

Диалкиловые эфиры нафтил (1-арил-3-метил-
пиразолон-5-ил-4) метанфосфоновых кислот
(VII—XVII). К смеси нафтилиденпиразолон и диалкилфосфористой
кислоты (диметилфосфита 3-кратный избыток; диэтилфосфита 2-кратный)
добавляют 0.5 мл насыщенного раствора метилата или этилата натрия
(соответственно радикалу диалкилфосфита). Реакция протекает при пере-
мешивании смеси с выделением тепла и последующем нагревании при
80—90° в течение 5—10 минут (до образования прозрачной жидкости).
Продукты реакции растворяют в этаноле и нагревают с активированным
углем. После испарения растворителя (в чашечках) трудно кристалли-
зующиеся густые жидкости перетирают с водой; при сушке на воздухе
они затвердевают в кристаллическую массу. Перекристаллизовывают
из диэтилового эфира и небольшого объема бензола. Повторно кристалли-
зуют из эфира. Из маточных растворов выделяют дополнительное коли-
чество продуктов (VII—XVII).

Полученные эфиры растворяются в органических растворителях,
очень трудно — в воде.

ИК-спектры сняты * на спектрофотометре UR-10 в виде суспензий
в вазелиновом масле.

В ы в о д ы

Реакции фосфорилирования 4-нафтилиден-1-арил-3-метилпиразоло-
нов-5 диалкилфосфитами в присутствии алкоголята натрия приводят
к образованию диалкиловых эфиров α-нафтил(1-арил-3-метилпиразолон-
5-ил-4)метанфосфоновой кислоты и β-нафтил(1-арил-3-метилпиразолон-
5-ил-4)метанфосфоновой кислоты. ИК-спектроскопией установлено, что
синтезированные эфиры имеют енольную форму.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Б. П. Луговкин, ЖОХ, 40, 1050 (1970).

Поступило в Редакцию
14 сентября 1970 г.
ЖОХ, т. 41, в. 9

Всесоюзный научно-исследовательский
институт охраны труда
Казань

УДК 547.185

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА МЕТИЛОВОГО ЭФИРА О-ФОСФОСЕРИНА

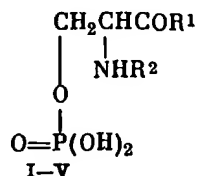
С. М. Аваева, В. А. Складкина

Изучение фосфорилированных производных аминокислот необходимо
для понимания функционирования фосфопротеинов и ферментов фосфор-
ного обмена.

Целью настоящей работы явилось изучение гидролитического поведе-
ния метилового эфира О-фосфосерина (I). Было установлено, что фосфо-

* За снятие спектров в химическом институте имени А. М. Бутлерова выражаю
благодарность В. С. Виноградовой.

эфирная связь в этом соединении характеризуется необычной лабильностью.



$\text{R}^1 = \text{OCH}_3$ (I), OH (III, V), NHCH_3 (II, IV); $\text{R}^2 = \text{H}$ (I-III), COC_2H_5 (IV), COSH (V).

Гидролиз метилового эфира О-фосфосерина проводили при 94° и ионной силе (μ) 0.1. О ходе гидролиза судили по количеству отщепившегося неорганического фосфата; в реакционной смеси также определяли количества О-фосфосерина и метилового эфира серина.

Ранее был описан гидролиз ряда производных О-фосфосерина (II-V) [1-3]. Показана устойчивость этих соединений в нейтральной среде и обнаружена легкость распада фосфоэфирной связи в соединениях (IV, V) в кислой области. В условиях существования моно-аниона наибольшая лабильность фосфоэфирной связи наблюдалась у О-фосфосерина, распад его в бифталатном буфере при pH 4 характеризуется константой скорости k_1 $2.4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$.

ТАБЛИЦА 1

Константы скорости гидролиза метилового эфира О-фосфосерина в присутствии кислот и оснований (100°, μ 0.1)

Условия гидролиза			$k_1 \cdot 10^{-3}, \text{ мин}^{-1}$
Буфер	pK _a	pH	
NaCl	—	6.1	0.05
Цитрат-ион	3.08 (pK ₁)	7	2.14
	4.74 (pK ₂)		
	5.4 (pK ₃)		
Ацетат-ион	4.73	6.5	0.74
Фталат-ион	5.1 (pK ₁)	6.9	2.65
	6.2 (pK ₂)		2.65
Аспартат-ион	3.9	6.9	0.55
Гидроксиламин	6	6.1	0.68
Имидазол	7	7.1	3.25

Изучение гидролиза метилового эфира О-фосфосерина (I) в бифталатном буфере при различных pH показало, что фосфоэфирная связь в этом соединении наиболее лабильна в области pH 5—8. В этих условиях метиловый эфир О-фосфосерина находится в форме дианиона и содержит протонированную аминогруппу [4]. При pH 6—7 имеет место ярко выраженный максимум гидролиза, и за 10 минут происходит практически полный распад соединения. Следует отметить, что период полураспада О-фосфосерина в оптимуме pH гидролиза (~ 4) составляет 6 часов [3].

Была изучена кинетика гидролиза метилового эфира О-фосфосерина в бифталатном буфере при pH 6.9 (табл. 1). Найденная константа скорости распада фосфоэфирной связи вещества (I) более чем на два порядка выше константы скорости гидролиза О-фосфосерина.

Далее было проведено исследование гидролитического поведения метилового эфира О-фосфосерина в различных буферных системах. Как видно из данных, представленных в табл. 1, наблюдаются существенные различия в скоростях гидролиза фосфоэфирной связи (I) в зависимости от условий гидролиза. Константы скорости распада эфира (I) в присутствии кислот и оснований в 10—100 раз превышают константы скорости гидролиза в воде, при этом скорость распада фосфоэфирной связи метилового эфира О-фосфосерина определяется pK кислоты или основания.

Для объяснения было проведено дет. эфира О-фосфосери кислоты. В случае распада (I) следова. связи фосфорного э связи).

RCOO-

Для идентифика серина использовал роллизатов исследова ведении гидролиза гидроксамовая кисл ного эфира О-фосфо фера присутствую серина и фосфорной серина. О-Ацилпрои жены не были. Сле О-фосфосерина в п фильного катализа, ей, а представляет

Следует подчерк в воде, т. е. в отсут точно быстро. Так, распадается на 65% зуется лишь на 10%

Хорошо известн связи в о-карбоксии кой и карбоксильно аналогии в гидролиг и о-карбоксиарилфо рость распада в обл. лабильность фосфоэфи кислоты и одинаков

Код и гидро О-ф

Условия ги

H₂O (3 час
Цитратный
Фосфатный
Ацетатный
Гидроксила

Можно предполо эфира (I) связан с

необычной лабиль-

Н₂ (IV), СООН, (V).

или при 94° и ион-
ству отщепившегося
е определяли коли-

О-фосфосерина (II—
нейтральной среде и
соединениях (IV, V)
аниона наибольшая
фосфосерина, распад
константой скорости

за
на
ний

л⁻¹, мин⁻¹

0.05

2.14

0.74

2.65

2.65

0.55

0.68

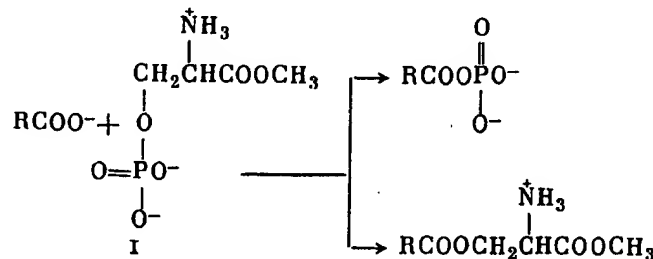
3.25

ина (I) в бифталат-
ирная связь в этом
тих условиях мети-
на и содержит про-
есто ярко выражен-
практически полный
тураспада О-фосфо-
асов [3].

ира О-фосфосерина
константа скорости
два порядка выше

о поведения метило-
емах. Как видно из
ственные различия
симости от условий
присутствии кислот
ти гидролиза в воде,
ового эфира О-фос-

Для объяснения необычно высокой скорости распада соединения (I) было проведено детальное исследование продуктов гидролиза метилового эфира О-фосфосерина в различных буферных системах, содержащих кислоты. В случае нуклеофильного катализа гидролиза среди продуктов распада (I) следовало ожидать образования ацилфосфатов (разрыв Р—О связи фосфорного эфира) или О-ацилпроизводных серина (разрыв С—О связи).



Для идентификации продуктов гидролиза метилового эфира О-фосфосерина использовали гидроксамовую реакцию. Кроме того, состав гидролизатов исследовали с помощью аминокислотного анализатора. При проведении гидролиза в присутствии гидроксилamina не была обнаружена гидроксамовая кислота. Кроме того, найдено, что в гидролизатах метилового эфира О-фосфосерина независимо от природы использованного буфера присутствуют эквимолекулярные количества метилового эфира серина и фосфорной кислоты, а также небольшие количества О-фосфосерина. О-Ацилпроизводные серина среди продуктов распада (I) обнаружены не были. Следовательно, ускорение гидролиза метилового эфира О-фосфосерина в присутствии кислот не является результатом нуклеофильного катализа, так как не сопровождается образованием новых связей, а представляет случай общего основного катализа.

Следует подчеркнуть, что гидролиз фосфоэфирной связи эфира (I) в воде, т. е. в отсутствие кислот или оснований, также происходит достаточно быстро. Так, за 3 часа при рН 6.1 метиловый эфир О-фосфосерина распадается на 65%, в аналогичных условиях О-фосфосерин гидролизуется лишь на 10%.

Хорошо известна высокая реакционная способность фосфоэфирной связи в о-карбоксиарилфосфатах, связанная с взаимодействием фосфатной и карбоксильной групп [5]. Обращают на себя внимание некоторые аналогии в гидролитическом поведении метилового эфира О-фосфосерина и о-карбоксиарилфосфатов. Эти соединения имеют максимальную скорость распада в области существования дианиона, необычно высокую лабильность фосфоэфирной связи по сравнению с моноэфирами фосфорной кислоты и одинаковый порядок скоростей гидролиза.

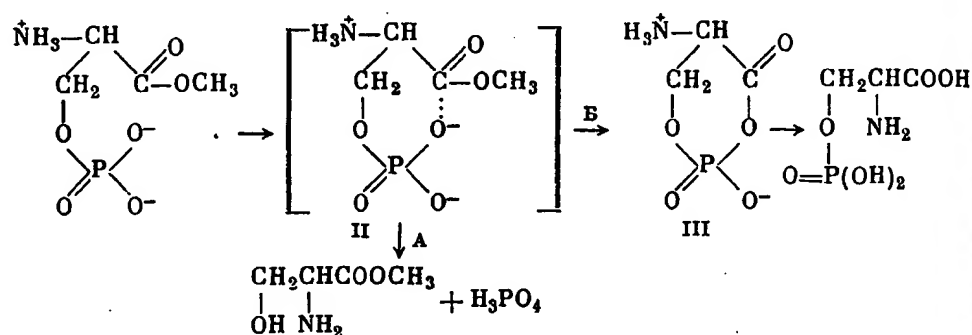
ТАБЛИЦА 2

Количественный анализ продуктов гидролиза 1 ммол метилового эфира О-фосфосерина (100°, μ 0.1, 25 минут)

Условия гидролиза	Продукты гидролиза, ммол		
	метиловый эфир серина	О-фосфосерин	Н ₂ РО ₄
Н ₂ О (3 часа)	0.45	0.06	0.45
Цитратный буфер	0.85	0.13	0.82
Фосфатный буфер	0.63	0.35	—
Ацетатный буфер	0.84	0.11	0.85
Гидроксиламин	0.81	0	0.80

Можно предположить, что быстрый гидролиз фосфоэфирной связи эфира (I) связан с внутримолекулярной координацией отрицательно

заряженной фосфорной группы и карбоксильного углерода с образованием промежуточного соединения (II). Такая координация атомов в пространстве облегчается наличием протонированной аминогруппы. Образование переходного состояния в свою очередь вызывает повышение реакционной способности фосфоэфирной связи, распад которой приводит к метиловому эфиру серина и фосфорной кислоте (направление А). Присутствие среди продуктов гидролиза О-фосфосерина позволяет предполагать, что переходное состояние (II) может сопровождаться образованием ацилфосфата (III) с одновременным омылением метилового эфира. Последнее соединение далее распадается по ангидридной связи и образует О-фосфосерин (направление Б).



Таким образом, гидролиз метилового эфира О-фосфосерина может проходить по двум различным направлениям. Следует отметить, что количественное соотношение продуктов распада эфира (I) определяется условиями гидролиза. Так, гидролиз в присутствии гидроксилamina проходит исключительно по направлению А, а в присутствии фосфорной кислоты становится весьма значительным направление Б.

Авторы выражают благодарность В. П. Корженко и М. Н. Галль за проведение анализов и обсуждение полученных результатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Метиловый эфир О-фосфосерина получали по описанному методу [6]. Количественное определение неорганического фосфата проводили по модифицированному методу [7], О-фосфосерина и серина на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi» модель KLA-3B.

Общая методика гидролиза метилового эфира О-фосфосерина. 1—2 ммол метилового эфира О-фосфосерина в 0.5 мл 0.1 н. раствора хлористого натрия или 0.1 н. буферного раствора выдерживали при 94°. Через определенные промежутки времени (2—180 минут) отбирали пробы, в которых определяли количества неорганического фосфата, О-фосфосерина и метилового эфира серина (табл. 2). Константу скорости реакции k_1 находили из графика зависимости $\ln \frac{c_0}{c}$ от

времени или по формуле $k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c}$, где c_0 — начальная концентрация (I) c — концентрация (I) в данный момент.

Гидролиз метилового эфира О-фосфосерина при pH 1.1—12.5 проводили в бифталатном буфере.

В ы в о д ы

1. Изучен гидролиз метилового эфира О-фосфосерина в воде и в буферных растворах. Обнаружена очень высокая скорость распада этого соединения в интервале pH 5—8; рассчитаны константы скорости гидролиза.

2. При распаде метилового эфира образуются метиловый эфир серина и фосфорная кислота.

3. Гидролиз метилового эфира серина в присутствии кислот и оснований.

[1] С. М. Аваева, В. А. Склякина, В. Манн, Н. Траппа [4] G. Fölsch, Svensley, E. M. Gindler [6] G. Fölsch, Acta Cl R. Grenn, Biochem.

Поступило в Редакцию 11 апреля 1970
ЖОХ, т. 41, в.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ АМИНОКИСЛОТНОЕ

Ю. А. Овчинн.

Ранее нами и другими исследователями (масс-спектральной последовательности). В развитие результатов исследования этого довольно для определения компонентов аламетиначеский метод.

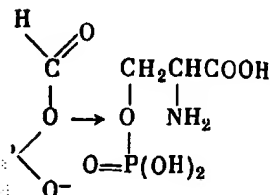
Полипептидный аламетин *choderma viride* [3], для изучения биологических процессов вызывающих зависящие от фосфолипидов.

Выделение и очистка. Полученный таким образом содержит не менее 95% (с 1.2, этанол); $M 17 \pm 100$ (титрование ш).

По данным аминокислотного анализа из остатков α -аминовой кислоты, L-аланин 7.4 : 2 : 3 : 1.6 : 2 : 1 октадекапептидом, а нецелочисленные значения аланина объясняются, представляет собой

* К пифигурация ал

ерода с образованием
ция атомов в про-
иногруппы. образо-
ает повышение реак-
которой приводит
аправление А). При-
позволяет предпола-
даться образованием
ового эфира. Послед-
и образует



фосфосерина может
т отметить, что коли-
) определяется усло-
ксиламина проходит
фосфорной кислоты

о и М. Н. Галль за
ультатов.

ГБ

санному методу [6].
га проводили по мо-
а на аминокислотном

лового эфира
фира О-фосфосерина
буферного раствора
кутки времени (2-
количества неоргани-
а серина (табл. 2).

зависимости $\ln \frac{c_0}{c}$ от
ная концентрация (I)

pH 1.1—12.5 прово-

рина в воде и в бу-
рость распада этого
танты скорости гид-

2. При распаде метилового эфира О-фосфосерина образуется фосфор-
ная кислота, метиловый эфир серина и О-фосфосерин.

3. Гидролиз метилового эфира О-фосфосерина ускоряется в присут-
ствии кислот и оснований.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] С. М. Аваева, Н. В. Раськова, О. В. Ковальчук, М. М. Бот-
винник, ЖОХ, сб. «Орг. соедин. фосфора», 230 (1967). — [2] С. М. Аваева,
В. А. Склянкина, В. Ю. Колесникова, Вестн. МГУ, 1970, 5. — [3] E. Ва-
mann, H. Tarmann, A. Schuegraf, Chem. Ber., 88, 1726 (1955). —
[4] G. Fölsch, Svensk. Kemisk Tidskrift, 78, 95 (1966). — [5] J. D. Chan-
ley, E. M. Gindler, H. Sobotka, J. Am. Chem. Soc., 74, 4347 (1952). —
[6] G. Fölsch, Acta Chem. Scand., 20, 471 (1966). — [7] H. Well-Melherbe,
R. Grenn, Biochem. J., 49, 286 (1951).

Поступило в Редакцию
11 апреля 1970 г.
ЖОХ, т. 41, в. 9

Московский государственный
университет

УДК 543.51 : 547.964.3 + 615.779.9

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ПЕПТИДАХ СТРОЕНИЕ АЛАМЕТИЦИНА

Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин, И. В. Кожевникова

Ранее нами и другими исследователями были показаны большие воз-
можности масс-спектрометрического метода для выяснения аминокислот-
ной последовательности в пептидах (см. [1, 2] и приведенную там лите-
ратуру). В развитие этих работ мы предприняли изучение строения поли-
пептидного антибиотика аламетицина; в настоящей статье сообщаются ре-
зультаты исследований, которые привели к установлению полной струк-
туры этого довольно сложного соединения пептидной природы, причем
для определения последовательности аминокислотных остатков во фраг-
ментах аламетицина был применен исключительно масс-спектрометри-
ческий метод.

Полипептидный антибиотик аламетицин, продуцируемый грибом *Tri-
choderma viride* [3], представляет значительный интерес как инструмент
для изучения биологических мембран, так как он обладает способностью
вызывать зависящее от потенциала изменение проницаемости бимолеку-
лярных фосфолипидных мембран для ионов щелочных металлов [4].

Выделение и очистка аламетицина были описаны нами ранее [5].
Полученный таким образом антибиотик хроматографически однороден,
содержит не менее 95% основного вещества, т. пл. 259—260°; $[\alpha]_D^{22}$ —45°
(с 1.2, этанол); M 1760 ± 50 (термоэлектрический метод, метанол), 1760 ±
± 100 (титрование щелочью).

По данным аминокислотного анализа молекула аламетицина построена
из остатков α-аминоизомасляной кислоты (Aib), L-пролина, L-глутами-
новой кислоты, L-аланина, L-валина, L-лейцина и глицина в соотношении
7.4 : 2 : 3 : 1.6 : 2 : 1 : 1*. Отсюда следует, что аламетицин является
октадекапептидом, а не нонадекапептидом, как это считалось ранее [3].
Нецелочисленные значения для остатков α-аминоизомасляной кислоты и
аланина объясняются, как это будет показано ниже, тем, что аламетицин
представляет собой смесь гомологичных антибиотиков.

* Конфигурация аминокислотных остатков установлена ранее [3].

STIC-ILL

10777541

106/6

From:
Sent:
To:

Lukton, David
Friday, June 06, 2003 11:02 AM
STIC-ILL

449402

David Lukton
308-3213
AU 1653
Examiner room: 9B05
Mailbox room: 9B01
Serial number: 09/646599

AN 92:17901 CA
TI Inactivation of inorganic pyrophosphatase from yeasts by o-phosphoserine
and its methyl ester

AU Svyato, I. E.; Sklyankina, V. A.; Avaeva, S. M.

SO Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2: Khimiya (1979), 20(5), 479-84
CODEN: VMUKA5; ISSN: 0579-9384

DT Journal
LA Russian

едения на них процесса уменьшения интенсивности. Подобные изменения в химическом расщеплении фос-

фатных групп регистрируются в области 500–600 см⁻¹, что исключает возможность влияния на них гидроксилирования после обработки при колебаниях изолированных независимо от природы

молекул Р-ОН обнаружены в области 3800 см⁻¹, интенсивность содержания окисленного обмена идентифицируется по характерным для фосфатов алюминия.

Фосфаты хрома и их влияние на строение фосфатных катализаторов ниже, чем для других изолированных

хрома существенно от фосфатов алюминия,

А. Н. Ещенко Л. С.

Ев. И. С. Колебательные

193.

Поступила в редакцию
22.09.78

УДК 577.153.35.02

И. Е. СВЯТО, В. А. СКЛЯНКИНА, С. М. АВАЕВА

ИНАКТИВАЦИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ О-ФОСФОСЕРИНОМ И ЕГО МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ

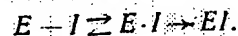
Неорганическая пирофосфатаза из дрожжей (КФ 3.6.1.1) в присутствии ионов двухвалентных металлов катализирует гидролиз неорганического пирофосфата, триполифосфата и их моноэфиров [1–3]. Фермент является олигомером, состоящим из двух химически идентичных субъединиц [4, 5].

Согласно современным представлениям, механизм действия пирофосфатазы включает фосфорилирование активного центра субстратом [6]. Образование фосфорилированного белка происходит также при взаимодействии фермента с неорганическим фосфатом [7]. На основании этого в лаборатории химии белка химического факультета МГУ было предложено использовать органические фосфаты для аффинной модификации неорганической пирофосфатазы. Так, было показано, что О-фосфозаноламины и его N-хлорацетильное производное специфически и необратимо инактивируют фермент, что, по-видимому, связано с блокированием групп активного центра [8, 9].

Широкое использование органических фосфатов для изучения механизма действия пирофосфатазы требует выяснения того, как особенности строения этих соединений сказываются на их взаимодействии с ферментом.

В настоящей работе проведено сравнительное изучение действия О-фосфосерина и его метилового эфира на неорганическую пирофосфатазу. Предстояло выяснить влияние свободной карбоксильной группы на реакцию с ферментом. Было установлено, что метиловый эфир О-фосфосерина является специфическим необратимым ингибитором неорганической пирофосфатазы. Ингибирование фермента исследовали, определяя во времени активность пирофосфатазы и количество реагента, связанного с белком. Как показано на рис. 1, метиловый эфир фосфосерина является эффективным ингибитором, и, например, при обработке белка 10⁻³ М реагентом через 10 мин фермент проявляет только 40% исходной активности, а через 1 ч наблюдается полная его инактивация.

Разбавление инкубационной смеси в 1000 раз или удаление избытка реагента гелефильтрацией не приводит к восстановлению активности, что свидетельствует о необратимом характере ингибирования. Необратимой инактивации белка предшествует образование комплекса фермент — ингибитор, т. е. реакция протекает по следующей схеме:



Этот вывод был сделан на основании исследования инактивации пирофосфатазы в присутствии различных концентраций (10^{-4} — $2 \cdot 10^{-3}$ M) метилового эфира О-фосфосерина (рис. 2). На рисунке видно, что реакция протекает в две стадии, различающиеся по скоростям. Уменьшение ферментативной активности на обеих стадиях соответствует кинетике псевдопервого порядка. Существенно, что с ростом концентрации ингибитора до 10^{-3} M происходит увеличение скорости ингибирования, а дальнейшее увеличение концентрации метилового эфира О-фосфосерина практически не сказывается на ней. Это указывает на насыщение

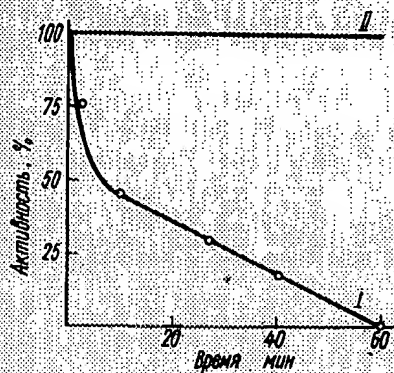


Рис. 1. Взаимодействие пирофосфатазы (10^{-7} M) с метиловым эфиром О-фосфосерина (10^{-3} M) в отсутствие (I) и в присутствии (II) 10^{-3} M пирофосфата калия

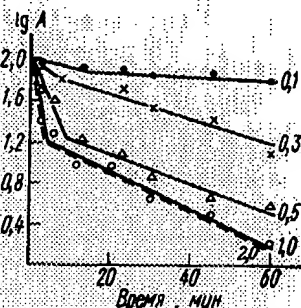


Рис. 2. Ингибирование пирофосфатазы (10^{-7} M) различными концентрациями метилового эфира О-фосфосерина. Концентрации ($M \cdot 10^{-3}$) реагента представлены против соответствующих кривых

фермента ингибитором. Из графика зависимости $t_{1/2}$ (время 50% инактивации) от концентрации ингибитора для первой стадии реакции была найдена константа ингибирования (K_i), характеризующая сродство метилового эфира О-фосфосерина к пирофосфатазе (рис. 3). Она составила 0,4 mM.

Полученный результат свидетельствует о специфичности реагента и дает основание полагать, что взаимодействие неорганической пирофосфатазы с метиловым эфиром О-фосфосерина проходит по активному центру. В пользу этого предположения говорит также полная защита фермента от действия ингибитора субстратом — неорганическим пирофосфатом (рис. 1, кривая II).

Скорость инактивации пирофосфатазы метиловым эфиром О-фосфосерина существенно зависит от pH. Особенно четко это проявляется для первой стадии реакции. На рис. 4 представлена зависимость константы скорости ингибирования на первой стадии от pH. Видно, что скорость очень мала в щелочной области (pH 7,5—8,5), но резко возрастает при переходе в кислую область (pH 7,5—6,25), а затем остается практически постоянной. На основании полученных зависимостей была определена pK группы, участвующей в этой реакции (рис. 4). Она составила 6,35. Возможно, что эта группа принадлежит имидазольному кольцу

гистидина. Ясно, что с вацией фермента. Анализ фосфатаноламина и его

Инактивация пиро О-фосфосерина является на ингибирования кор реагента, и полностью ингибитора в расчете н

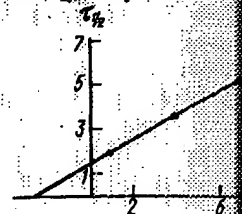


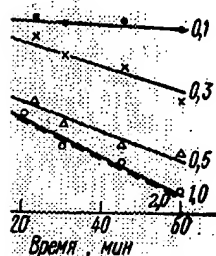
Рис. 3. Зависимость в 50% ингибирования пирофосфатазы от грации метилового О-фосфосерина

Проведенное ранее фосфатазы О-фосфосерина ферменте содержится прочная амидная и ла разрушена действием частичной реактивации фосфатная связи между различными субединицами.

Метиловый эфир О-фосфосерина и содержит д аминную. Можно было в том случае будет про оказалось, что если пиром О-фосфосерина, в ние количества, связан во времени и сопроводности. Важно отметить может быть реактивировать позволяют предполагать с О-фосфатаноламином образуется модифици по природе связи с реа

О-фосфосерин, в с держит свободную ка дит к существенным р фосфосерин эффективно в отличие от реакции с ние имеет обратимый 10^{-3} M раствором О-ф

ледования инактивации ингибиторов (10^{-4} — $2 \cdot 10^{-3}$ М) рисунке видно, что реакция по скоростям. Уменьшение соответствует кинетике с ростом концентрации скорости ингибирования, этого эфира О-фосфосерина указывает на насыщение



ингибирование пирофосфатазы (10^{-4} М) различными концентрациями метилового эфира О-фосфосерина. Концентрация (0-1) реагента против соответствующих кривых

$\tau_{1/2}$ (время 50% инактивации первой стадии реакции) была характеризующая сродство к газу (рис. 3). Она со-

специфичности реагента неорганической пирофосфатазы проходит по активному центру также полная загрузка — неорганическим

эфиром О-фосфосерина. Это проявляется для зависимости константы скорости. Видно, что скорость резко возрастает при изменении концентрации. Исследования были определены (рис. 4). Она составила 10-3 М раствором О-фосфосерина и затем разбавить реакционную смесь

гистидина. Ясно, что ее протонирование увеличивает скорость инактивации фермента. Аналогичные результаты были получены для О-фосфоэтаноламина и его N-хлорацетильного производного [8, 9].

Инактивация пирофосфатазы под действием метилового эфира О-фосфосерина является результатом модификации фермента. Глубина ингибирования коррелирует с количеством связанного с белком реагента, и полностью неактивная пирофосфатаза содержит один моль ингибитора в расчете на одну субъединицу.

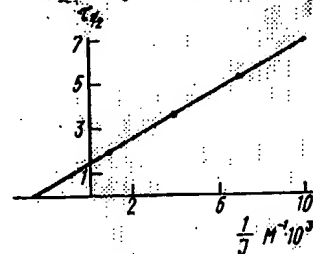


Рис. 3. Зависимость времени 50% ингибирования ($\tau_{1/2}$) пирофосфатазы от концентрации метилового эфира О-фосфосерина

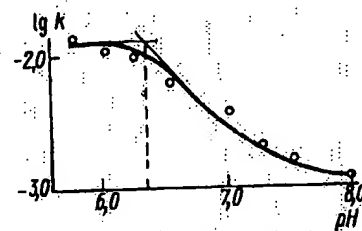


Рис. 4. Зависимость константы скорости первой стадии реакции пирофосфатазы с метиловым эфиром О-фосфосерина от pH

Проведенное ранее детальное исследование модификации пирофосфатазы О-фосфоэтаноламином показало, что в инактивированном ферменте содержатся две различные по природе связи с ингибитором — прочная амидная и лабильная ацилфосфатная, которая может быть разрушена действием субстрата или имидазола, что сопровождается частичной реактивацией фермента. Существенно, что амидная и ацилфосфатная связи между белком и ингибитором присутствуют в различных субъединицах.

Метилловый эфир О-фосфосерина является аналогом О-фосфоэтаноламина и содержит две реакционноспособные группы — фосфатную и аминную. Можно было думать, что модификация пирофосфатазы в данном случае будет происходить аналогично описанному. Действительно, оказалось, что если пирофосфатазу, инактивированную метиловым эфиром О-фосфосерина, выдержать с имидазолом, наблюдается уменьшение количества связанного с белком реагента. Этот процесс развивается во времени и сопровождается восстановлением ферментативной активности. Важно отметить, что полностью инактивированный фермент может быть реактивирован только на 50%. Полученные результаты позволяют предполагать, что так же, как и в реакции пирофосфатазы с О-фосфоэтаноламином, в случае метилового эфира О-фосфосерина образуется модифицированный фермент, содержащий две различные по природе связи с реагентом — ацилфосфатную и амидную.

О-фосфосерин, в отличие от метилового эфира О-фосфосерина, содержит свободную карбоксильную группу. Это обстоятельство приводит к существенным различиям в его действии на пирофосфатазу. Фосфосерин эффективно подавляет пирофосфатазную активность. Однако, в отличие от реакции с метиловым эфиром О-фосфосерина, ингибирование имеет обратимый характер. Так, если пирофосфатазу обработать 10^{-3} М раствором О-фосфосерина и затем разбавить реакционную смесь

ость. В то же время при присутствии 10^{-3} — 10^{-2} М ионно-ферментативной активности пирогосфатазы.

причиной такой инактивации О-фосфосерина, по-видимому, является модифицирование фермента неорганическим фосфатом. Предварительное разложение пирогосфатазы, обработанной 0,05%-ным додецилсульфатом, связанного с молекулой реагента на молекулу

эффективно и специфично, различающаяся при этом

Она характеризуется тем, что легко гидролизует, и смещена в сторону увеличения третичной структуры

действия на неорганический эфир показало, что подавляют ферментативную активность О-фосфосерина является карбоксильной группой, и оно становится

из маточных пекарских дрожжей модифицированной метилового фермента составляла

сефадекс Г-50 (Серва, тирамин-бисетан-сульфат) и метиловый эфир

и пирогосфатазы определяли в течение 2—10 мин при $1,7 \cdot 10^{-3}$ М сульфат. Остатки фосфата определяли [12].

метиловым эфиром фосфосерина инкубировали при 30°C

в 0,05 М—0,1 М буфере (рН 5,5—8,5), содержащем $1,25 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ М метиловый эфир фосфосерина. Через определенные промежутки времени (0—90 мин) отбирали аликвоты для определения активности фермента. Одновременно определяли количество связанного с белком ингибитора. Для этого пробы, содержащие 0,5 мг фермента, лиофильно высушивали, обессоливали на колонке с сефадексом Г-50, минерализовали в смеси концентрированной хлорной кислоты и 10 н серной кислоты и определяли количество неорганического фосфата [13].

Расчет константы скорости реакции. Строили графики зависимости ферментативной активности пирогосфатазы от времени инкубации с метиловым эфиром О-фосфосерина. Суммарную константу скорости реакции рассчитывали по формуле $\lg \alpha = 0,434 (k_1 + k_2)$, где α — угол наклона первого прямолинейного участка. Константу реакции второй стадии вычисляли по формуле $\lg \beta = 0,434 k_2$, где β — угол наклона второго прямолинейного участка.

Реакция пирогосфатазы, инактивированной метиловым эфиром О-фосфосерина, с имидазолом. Фермент (10^{-7} М) инкубировали в 0,1 М ПИПЭС буфере рН 7,2, содержащем метиловый эфир О-фосфосерина (10^{-3} М), при 30°. Из инкубационной смеси через 0—90 мин отбирали аликвоты, разбавляли в 500 раз 0,1 М раствором имидазола рН 7,2, выдерживали в течение 1—24 ч при 30° и определяли ферментативную активность и количество ингибитора, связанного с белком, как указано в общей методике.

Определение активности пирогосфатазы в присутствии О-фосфосерина. 0,01 мг фермента прибавляли к 10 мл 0,05 М трис-НСI буферного раствора рН 7,2, содержащего $1,7 \cdot 10^{-3}$ М пирогосфат натрия, $1,7 \cdot 10^{-3}$ М хлористый магний и 10^{-3} — $1,5 \cdot 10^{-3}$ М О-фосфосерина. Реакционную смесь инкубировали 5 мин, добавляли 0,1 мл 4 н серной кислоты и определяли количество неорганического фосфата. В контрольном опыте фермент выдерживали в тех же условиях, но без О-фосфосерина.

Определение количества О-фосфосерина, связанного с пирогосфатазой. 0,2 мг пирогосфатазы в 20 мл 0,1 М буферного раствора МЭС—NaOH, рН 6,5, содержащем 10^{-3} М фосфосерин, выдерживали в течение 1 ч при 30°. Реакционную смесь лиофильно высушивали, белок растворяли в 0,5 мл 0,05%-ном додецилсульфате натрия и подвергали гель-фильтрации на колонке со смолой Сефадекс Г-50, уравновешенной 0,05%-ным додецилсульфатом натрия. Элюцию проводили 0,05%-ным раствором додецилсульфата натрия. Фракции анализировали на содержание белка и фосфосерина. В контрольном опыте белок инкубировали в тех же условиях, но без фосфосерина, а затем подвергали аналогичной обработке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitz M. «J. Gen. Physiol.», 1952, 35, 423.
2. Шафранский Ю. А., Байков А. А., Андрукович П. Ф., Аваева С. М. «Биохимия», 1977, 42, 1244.
3. Schlesinger M., Coon M. «Biochim. et biophys. acta», 1960, 41, 30.
4. Ridlington F. W., Butler L. G. «J. Biol. Chem.», 1972, 247, 7303.
5. Cohen S. A., Sterner R., Reim P. S., Heinkikson R. L. «J. Biol. Chem.», 1978, 253, 889.
6. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Awaeva S. M. «Biochim. et biophys. acta», 1977, 481, 184.

7. Аваева С. М., Назарова Т. И. «Химия природ. соед.», 1970, 2, 243.
8. Аваева С. М., Дяков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. «Биоорг. химия», 1977, 3, 943.
9. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. «Биоорг. химия», 1978, 4, 984.
10. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. «Биохимия», 1973, 38, 344.
11. Fölsch G. «Acta Chem. Scand.», 1966, 36, 471.
12. Bayk v A. A., Awaeva S. M. «Eur. J. Biochem.», 1973, 32, 136.
13. Hess H., Derr J. «Anal. Biochem.», 1975, 63, 607.

Кафедра химии
природных соединений

Поступила в редакцию
29.08.78

УДК 577.663.1:15.062

В. И. ЯКОВЛЕВ
В. А. СЫСУЕВ

ФЕРМЕНТАТИВН П

Аминокислоты находят применение в народном хозяйстве и постоянно возрастает [1]. Новым направлением получения является ферментативный процесс в мягких условиях синтеза. Аминокислоты получают в виде побочных продуктов синтеза природной, L-форме.

Тирозин и ДОФА являются основными продуктами эффективного синтеза тирозина, или β-тирозины, или сальфосфат-зависимый превращение тирозина [2, 3, 4] было показано, что в процессе синтеза тирозина участвуют пируват и аммония катион, фенол-лиаза, так и с катионом фермента.

Клетки *Erwinia hermannica* обладают активностью катализировать превращение тирозина в выходом в зависимости от 43 до 53,5 г/л тирозина.

серин+фенол (при

При высоких концентрациях тирозина, аммония синтез тирозина, тирозин, и в обратимой реакции превращения фенола на поверхности клеток и условий пр

тирозин+

В этом случае был достигнут

В данной статье описан синтез тирозина из фенола с помощью клеток бактерий, обладающих фенол-лиазной активностью.

Бактерию *Citrobacter freundii* из мясного бульона с дрожжами

L2 ANSWER 1 OF 3 CA COPYRIGHT 2003 ACS

AN 92:17901 CA

TI Inactivation of inorganic pyrophosphatase from yeasts by o-phosphoserine
and its methyl ester

AU Svyato, I. E.; Sklyankina, V. A.; Avaeva, S. M.

CS Mosk. Gos. Univ., Moscow, USSR

SO Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2: Khimiya (1979), 20(5), 479-84
CODEN: VMUKA5; ISSN: 0579-9384

DT Journal

LA Russian

L2 ANSWER 2 OF 3 CA COPYRIGHT 2003 ACS

AN 76:46490 CA

TI Hydrolysis of the methyl ester of O-phosphoserine

AU Avaeva, S. M.; Sklyankina, V. A.

CS Mosk. Gos. Univ., Moscow, USSR

SO Zhurnal Obshchei Khimii (1971), 41(9), 2081-5
CODEN: ZOKHA4; ISSN: 0044-460X

DT Journal

LA Russian